

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 9月30日

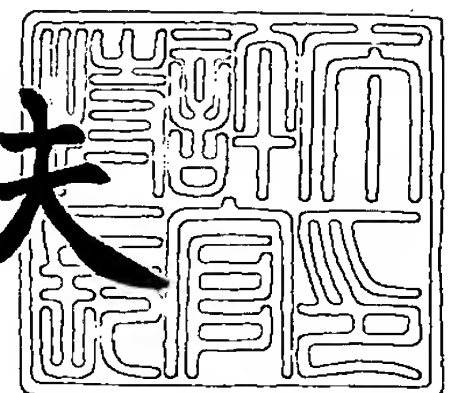
出願番号
Application Number: 特願2002-285454
[ST. 10/C]: [JP 2002-285454]

出願人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社

2003年 8月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3069716



【書類名】 特許願

【整理番号】 A21605A

【提出日】 平成14年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 B01J 19/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 須藤 幸夫

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205141

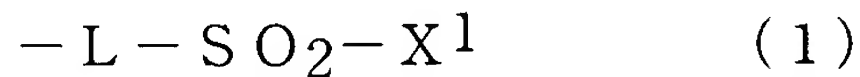
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロリアクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 特異的結合パートナーの一員と結合することができる下記式 (1) で表される基が流路壁面の一部または全面に結合している、反応性マイクロリアクター。



[式中、 X^1 は、 $-CR^1=CR^2R^3$ または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし、 Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わす；そして、 L は連結基を表わす]。

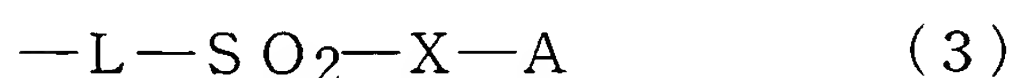
【請求項 2】 表面に反応性基が導入されたマイクロリアクターに、下記式 (2)：



[式中、 X^1 および X^2 は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし； R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わす；そして、 L^2 は連結基を表わす]

で表わされるジスルホン化合物を接触させることを含む、請求項 1 に記載の反応性マイクロリアクターの製造方法。

【請求項 3】 特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式 (3) で表される基が流路壁面の一部または全面に結合している、生物学的素材結合マイクロリアクター。



[式中、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ とマイクロリアクター内流路壁面とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^{11}(\text{R}^{12})\text{—CR}^{13}(\text{R}^{14})\text{—}$ を表し、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 及び R^{14} は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。]

【請求項4】 請求項1に記載の反応性マイクロリアクターに、上記式(1)で表される基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることを含む、請求項3に記載の生物学的素材結合マイクロリアクターの製造方法。

【請求項5】 請求項3に記載の生物学的素材結合マイクロリアクターと、該マイクロリアクターの表面に担持された特異的結合パートナーの一員と特異的に結合する標的物質を含む検体とを接触させる工程；及び

該特異的結合パートナーの一員と該標的物質との間の相互の結合の形成を検出する工程；

を含む、標的物質を検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子の発現、変異、多型等の解析やプロテオミクス解析などに非常に有用であるDNAやタンパク質等の生物学的素材をマイクロリアクター流路壁面に固定化した生物学的素材結合マイクロリアクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

多彩な生物の遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が急速に進んでおり、それらのDNAもしくはDNA断片の塩基配列を解析するために、いわゆるマイクロリアクターの壁面に多数のDNA断片あるいは合成オリゴヌクレオチドなどのヌクレオチド誘導体を固定しDNAもしくはDNA断片の塩基配列を解析する手法が試みられてきている。

【 0 0 0 3 】

多種類の DNA（又は mRNA）を同時に検出する方法として DNA チップが開発されている。DNA チップにおいては、ガラス板等の平板上に DNA が固定されており、検体である DNA はこの平板上に展開されてハイブリダイゼーションが行わなければならない。そのため、検体は少なくとも DNA チップ全面を覆い尽くすだけの液量まで希釈される必要があり、例えば通常の S t a n f o r d 型 DNA マイクロアレイでは、少なくとも $50\ \mu\text{l}$ の検体液量が必要である。また、平板上に展開された検体 DNA は、拡散が遅いため反応に関与している検体 DNA は数パーセントしかない。平板上に展開されたいわゆる DNA チップでは、かかる問題点により、目的とする検出感度を得られないという欠点をもっている。一方、マイクロリアクター系においては、検体を数 μl まで濃縮可能であり、しかも液を流すことにより、固定されているすべての DNA と順次接触させることが可能であり、平板上の DNA チップを凌駕する高感度の検出系を設計することが可能となっている。

【 0 0 0 4 】

マイクロリアクターは前述したような DNA 検出だけではなく、タンパク質、抗原、抗体、レセプター、リガンド、RNA などの検出にも使用されようとしている。このような系においてはマイクロリアクター内に検体と特異的な結合をする物質が固定されなければならない。

【 0 0 0 5 】

このようなマイクロリアクターに特異的結合物質が固定された、いわゆる生物学的素材結合マイクロリアクターを実用化するためには、多数の DNA 断片やオリゴヌクレオチド、抗原、抗体などの特異的結合物質をマイクロリアクター内流路壁面に安定に結合させる技術が必要とされる。

【 0 0 0 6 】

予め調製用意した DNA 断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合固定する方法としては、DNA 断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法が知られている。

(1) 固定する DNA 断片が c DNA（mRNA を鋳型にして合成した相補的

DNA) やPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅させたDNA断片) である場合には、cDNAあるいはPCR産物を、DNAチップ作製装置に備えられたスポット装置により、ポリ陽イオン化合物 (ポリリシン、ポリエチレンジアミン等) で表面処理したガラスの表面に点着し、DNA断片の持つ電荷を利用してガラス表面に静電結合させるのが一般的である。なお、ガラス表面の処理方法としては、アミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている。このシランカップリング剤を用いた表面処理では、アミノ基、アルデヒド基等は、共有結合によりガラス表面表面に固定されるため、ポリ陽イオン化合物による表面処理の場合と比較して、安定にガラス表面表面に固定される。

【0007】

上記のDNA断片の電荷を利用する方法の変法として、アミノ基で修飾したPCR産物をSSC (標準食塩—クエン酸緩衝液) に懸濁させ、これをシリル化したスライドガラス表面に接触し、インキュベートした後、水素化ホウ素ナトリウムによる処理および加熱処理を順に行なう方法が報告されている。しかし、この固定方法では必ずしも十分なDNA断片の固定安定度が得られ難いという問題がある。

【0008】

(2) 固定するオリゴヌクレオチド (プローブ分子) が合成オリゴヌクレオチドである場合には、まず反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを合成し、予め反応性基を形成させるように表面処理した固相担体表面に該オリゴヌクレオチドを接触して、該オリゴヌクレオチドを固相担体表面に共有結合により結合固定させる方法も知られている。例えば、表面にアミノ基を導入した固相担体に、PDC (p-フェニレンジイソチオシアネート) の存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの二つの方法は、前記(1)のDNA断片の電荷を利用して静電結合により固定する方法と比べると、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に結合固定されるという利点がある。しかし、PDCを存在させる方法は、PDCとアミノ基導入オリゴヌクレオチ

ドとの反応が遅く、またアルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを用いる方法では、反応生成物である Schiff 塩基の安定性が低い（従って、加水分解が起こり易い）という問題点がある。

【0009】

一方、ゲノム解析もほぼ終わり、遺伝子情報の持つ意味を最終的に理解し、細胞の生命活動をシミュレートするために不可欠な情報を提供する「プロテオーム・プロテオミクス」研究が進められている。プロテオームとは、特定の細胞、器官、臓器の中で翻訳生産されているタンパク質の全セットを意味し、さらには化学構造、総量、発現時期、翻訳後修飾、集合体形成などの高次情報解析の研究分野のことを「プロテオミクス」と呼ぶ。

【0010】

プロテオーム研究は、タンパク質のプロファイリング、タンパク質の同定・精密分析、相互作用ネットワーク解析、プロテオームデータベースの構築からなり、それを生命科学研究への応用していくという分野である。

このうち、相互作用ネットワーク解析法としては、酵母 two-hybrid 法やファージディスプレイ法、アフィニティキャプチャーを利用した方法として免疫沈降法や BIA-MMS 法、カラムスイッチング質量分析法などが行われている（非特許文献 1）。以上に挙げた相互作用解析方法はいずれも、ハイスループット解析には至っていない。

【0011】

Schreiber らにより、ハイスループットなタンパク質の相互作用解析のためのタンパク質マイクロアレイに関する報告がなされた（非特許文献 2）。これは、アルデヒド基をもったスライドガラス上にタンパク質水溶液を点着し、BSA 溶液でブロッキング後、タンパク溶液と反応させ蛍光スキャナーで検出するものである。この場合はアルデヒド基とアミノ基との反応生成物である Schiff 塩基の安定性が低い（通常、加水分解が起こり易い）という問題点を有する。

【0012】

このほかタンパク質を固相に固定化される方法として、特許文献 1 には、タンパク質の末端に疎水性のポリペプチドを導入して、固相に固定化する方法が記載

されている。

特許文献2には、プロテインA分子膜による抗体タンパク質を固定化する方法が記載されている。

【0013】

【非特許文献1】

プロテオーム解析法、163-211、羊土社、2000

【0014】

【非特許文献2】

Science、289、1760-1763、2000

【0015】

【特許文献1】

特公平7-53108号

【0016】

【特許文献2】

特許2922040号

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、迅速かつ安定に結合固定可能な反応性マイクロリアクター、該反応性マイクロリアクター内流路壁面に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材結合マイクロリアクター、並びにそれらの製造方法を提供することを解決すべき課題とする。さらに本発明は、上記した生物学的素材結合マイクロリアクターを用いた特異的結合パートナーの他の一員である標的物質の検出方法を提供することを解決すべき課題とした。

【0018】

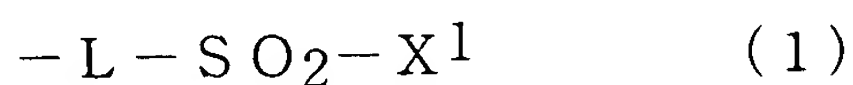
【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、スルホニル基を介した共有結合により少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員をマイクロリアクター内流路壁面マイクロリアクター内流路壁面に結合した生物学的素材結合マイクロリアクターを作製した結果、迅速かつ安定に該特異的結合パートナーの

一員をマイクロリアクター内流路壁面マイクロリアクター内流路壁面に結合でき、標的物質を効率的に感度よく検出できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0019】

本発明によれば、特異的結合パートナーの一員と結合することができる下記式(1)で表される基が流路壁面の一部または全面に結合している、反応性マイクロリアクターが提供される。



[式中、 X^1 は、 $-CR^1=CR^2R^3$ または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし、 Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わす；そして、 L は連結基を表わす]。

【0020】

本発明の別の側面によれば、表面に反応性基が導入されたマイクロリアクターに、下記式(2)：



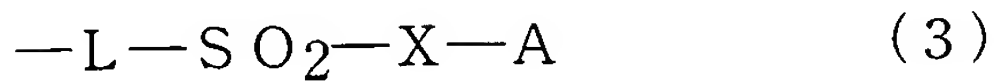
[式中、 X^1 および X^2 は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし； R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わす；そして、 L^2 は連結基を表わす]

で表わされるジスルホン化合物を接触させることを含む、反応性マイクロリアクターの製造方法が提供される。

【0021】

本発明のさらに別の側面によれば、特異的結合パートナーの一員の残基を有す

る下記式（3）で表される基が流路壁面の一部または全面に結合している、生物学的素材結合マイクロリアクターが提供される。



[式中、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ とマイクロリアクター内流路壁面とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^{11}(\text{R}^{12})\text{—CR}^{13}(\text{R}^{14})\text{—}$ を表し、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 及び R^{14} は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。]

【0022】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の反応性マイクロリアクターに、上記式（1）で表される基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることを含む、生物学的素材結合マイクロリアクターの製造方法が提供される。

【0023】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の生物学的素材結合マイクロリアクターと、該マイクロリアクターの表面に担持された特異的結合パートナーの一員と特異的に結合する標的物質を含む検体とを接触させる工程；及び

該特異的結合パートナーの一員と該標的物質との間の相互の結合の形成を検出する工程；

を含む、標的物質を検出する方法が提供される。

【0024】

上記した本発明によるマイクロリアクターにおいて、好ましい態様としては以下の態様が挙げられる。

特異的結合パートナーがマイクロリアクターの流路壁面的一部分または全面に結合している態様；

複数の特異的結合パートナーがマイクロリアクターの流路壁面の異なる位置に結合している態様；

特異的結合パートナーが、生物学的な特異的結合を形成する構成員からなる態

様；

特異的結合パートナーが、抗体もしくは抗体フラグメントとリガンドとの組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントと抗原との組み合わせ、抗体もしくは抗体フラグメントとハプテンとの組み合わせ、あるいはレセプターとリガンドとの組み合わせである態様；

特異的結合パートナーが、アビジン類とビオチン類との組み合わせである態様；

アビジン類が、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体である態様；

ビオチン類がビチオン、ビオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチン、またはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体である態様；

【0 0 2 5】

特異的結合パートナーが、核酸と核酸との組み合わせ、又は核酸と核酸結合物質との組み合わせである態様；

核酸が、ヌクレオチド誘導体、ペプチド核酸、又は L N A である態様；

核酸結合物質が 2 本鎖 D N A 認識物質である態様；

2 本鎖 D N A 認識物質が 2 本鎖 D N A 認識抗体である態様；

2 本鎖 D N A 認識物質が D N A 転写因子である態様；

2 本鎖 D N A 認識物質が、Z n フィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフをもつタンパク質である態様；

2 本鎖 D N A 認識物質がペプチド核酸である態様；

式 (I) において、A がタンパク質の残基を示す態様；

【0 0 2 6】

マイクロリアクター内流路壁面がガラス、石英、プラスチック、シリコン樹脂、電極表面、又はセンサーチップ表面である態様；並びに

マイクロリアクター内流路壁面に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させた後に、表面にあるフリーの反応性基をアミノ酸、ペプチドもしくはタンパク質水溶液でブロッキング処理する態様；

【0 0 2 7】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の反応性マイクロリアクター及びその製造方法

本発明におけるマイクロリアクターとは、等価直径 1 mm 以下の流路（チャンネル）を有する装置のことである。マイクロリアクターは例えば固体基板上に微細加工技術により作成でき、また、固体基板上のパターンを鋳型にしてモルディング法等によっても作成することができる。

【0028】

本発明でいう等価直径（equivalent diameter）は、相当（直）径、とも呼ばれ、機械工学の分野で用いられる用語である。任意断面形状の配管（本発明では流路）に対し等価な円管を想定するとき、その等価円管の直径を等価直径といい、 A ：配管の断面積、 p ：配管のぬれぶち長さ（周長）を用いて、 $d_{eq} = 4A/p$ と定義される。円管に適用した場合、この等価直径は円管直径に一致する。等価直径は等価円管のデータを基に、その配管の流動あるいは熱伝達特性を推定するのに用いられ、現象の空間的スケール（代表的長さ）を表す。等価直径は、一辺 a の正四角形管では $d_{eq} = 4a^2/4a = a$ 、一辺 a の正三角形管では $d_{eq} = a/$ 、路高さ h の平行平板間の流れでは $d_{eq} = 2h$ となる（参照：（社）日本機械学会編「機械工学事典」1997年、丸善（株））。

【0029】

このようなマイクロスケールの流路（チャンネル）を有する反応装置は、一般に「マイクロリアクター」と総称され、最近大きな発展を遂げている（W.Ehrfeld, V.Hessel, H.Lowe, "Microreactor", 1Ed. (2000), WILEY-VCH）。

【0030】

本発明の流路は、固体基板上に微細加工技術により作成される。使用される材料の例をあげれば金属、シリコン、テフロン（登録商標）、ガラス、石英、シリコン樹脂、セラミックスまたはプラスチックなどである。耐熱、耐圧および耐溶剤性が必要な場合、好ましい材料は金属、シリコン、テフロン（登録商標）、ガラスまたはセラミックスであるが、特に好ましくは金属である。金属の例を挙げれば、ニッケル、アルミ、銀、金、白金、タンタル、ステンレス、ハステロイ（

Ni-Fe系合金) またはチタンであるが、好ましくは耐腐食性の高いステンレス、ハステロイもしくはチタンである。

【0031】

流路を作成するための微細加工技術として代表的なものを挙げれば、X線リソグラフィを用いるLIGA技術、EPON SU-8を用いた高アスペクト比フォトリソグラフィ法、マイクロ放電加工法(μ -EDM)、Deep RIEによるシリコンの高アスペクト比加工法、Hot Emboss加工法、光造形法、レーザー加工法、イオンビーム加工法、およびダイヤモンドのような硬い材料で作られたマイクロ工具を用いる機械的マイクロ切削加工法などがある。これらの技術を単独で用いても良いし、組み合わせて用いても良い。好ましい微細加工技術は、X線リソグラフィを用いるLIGA技術、EPON SU-8を用いた高アスペクト比フォトリソグラフィ法、マイクロ放電加工法(μ -EDM)、および機械的マイクロ切削加工法である。

【0032】

本発明に用いられる流路は、シリコンウエファー上にフォトレジストを用いて形成したパターンを鋳型とし、これに樹脂を流しこみ固化させる(モールドイング法) ことによっても作成することができる。モールドイング法には、PDMS (Polydimethylsiloxane) またはその誘導体に代表されるシリコン樹脂を使用することができる。

【0033】

マイクロリアクターの温度制御は、装置全体を温度制御された容器中に入れることにより制御しても良いし、金属抵抗線や、ポリシリコンなどのヒーター構造を装置内に作り込み、加熱についてはこれを使用し、冷却については自然冷却でサーマルサイクルを行ってもよい。温度のセンシングは、金属抵抗線ではヒーターと同じ抵抗線をもう一つ作り込んでおき、その抵抗値の変化に基づいて温度検出を行い、ポリシリコンについては熱電対を用いて検出を行う。また、ペルチェ素子をリアクターに接触させることによって外部から加熱、冷却を行っても良い。どの方法を用いるかは用途やリアクター本体の材料などに合わせて選択される。

【0034】

マイクロリアクターの流路壁面には、ジビニルスルホン化合物などの二官能反応性化合物を共有結合により結合固定するために、ポリ陽イオン化合物（例えば、ポリ-L-リシン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン等であることが好ましく、ポリ-L-リシンであることがさらに好ましい）などのアミノ基を側鎖に有するポリマーによって被覆処理（この場合、マイクロリアクターの表面へ導入される反応性基は、アミノ基である）することができる。あるいは、マイクロリアクターの流路壁面は、シランカップリング剤などのマイクロリアクター表面と反応する反応性基と、そして別にアミノ基などの反応性基を有する表面処理剤によって接触処理することができる。

【0035】

マイクロリアクターの流路壁面は、ポリ陽イオン化合物による被覆処理の場合には、アミノ基もしくはメルカプト基がポリマー化合物とマイクロリアクターの流路壁面との静電結合によってマイクロリアクターの流路壁面に導入されるのに対して、シランカップリング剤による流路壁面処理の場合には、マイクロリアクターの流路壁面に共有結合によって結合固定されるため、アミノ基もしくはメルカプト基がマイクロリアクターの流路壁面に安定に存在する。アミノ基およびメルカプト基の他に、アルデヒド基、エポキシ基、カルボキシル基、あるいは水酸基も好ましく導入することができる。

【0036】

アミノ基を有するシランカップリング剤としては、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N- β （アミノエチル）- γ -アミノプロピルトリメトキシシランあるいはN- β （アミノエチル）- γ -アミノプロピルメチルジメトキシシランを用いることが好ましく、 γ -アミノプロピルトリエトキシシランを用いることが特に好ましい。

【0037】

ポリ陽イオン化合物を用いる処理に、シランカップリング剤による処理を組み合わせ行ってもよい。この方法により、疎水性、あるいは親水性の低いマイクロリアクターとDNA断片との静電的相互作用を促進することができる。ポリ陽

イオン化合物による処理がされたマイクロリアクターの流路壁面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって、ポリ陽イオン化合物による処理がされたマイクロリアクターの凹凸を軽減することができる。マイクロリアクターの種類によっては、その中に親水性高分子等を含有させることも可能であり、このような処理を施したマイクロリアクターを用いることもできる。

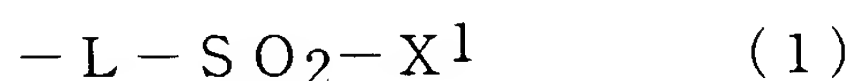
【0038】

反応性基を備えたマイクロリアクターは、ジビニルスルホン化合物などの二官能性反応性化合物と接触することによって、その反応性基と二官能性反応性化合物とが反応し、共有結合が形成され、マイクロリアクターの反応性基部分が延長され、その先端もしくは先端附近にビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を持つ反応性鎖が形成され、これにより本発明の反応性マイクロリアクターが生成する。

【0039】

本発明の反応性マイクロリアクターにおいて、その流路壁面に導入されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と連結基との連結体は、下記の式（1）により表わされる。

【0040】



【0041】

式（1）において、 X^1 は、 $-CR^1=CR^2R^3$ または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ （反応性前駆体基）を表わす。 R^1 、 R^2 および R^3 は、それぞれ互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基を表わす。

【0042】

炭素原子数が1乃至6のアルキル基の例としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 n -ブチル基、及び n -ヘキシル基を挙げることができ、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数が6乃至20のアリール基としては、フ

エニル基及びナフチル基を挙げることができる。R¹、R²及びR³は共に水素原子であることが好ましい。

【0043】

炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基の例としては、上記した炭素原子数が1乃至6のアルキル基の例と炭素原子数が6乃至20のアリール基の例とを組み合わせたものが挙げられる。

【0044】

Yは、-OH、-OR⁰、-SH、NH₃、NH₂R⁰（但し、R⁰は、水素原子を除く、アルキル基などの基である）などの求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わし、その例としては、ハロゲン原子、-OSO₂R²¹、-OCOR²²、-OSO₃M、あるいは四級ピリジニウム基（R²¹は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基を表わし；R²²は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基あるいは炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基を表わし；Mは、水素原子、アルカリ金属原子あるいはアンモニウム基を表わす）を挙げることができる。

【0045】

式（1）において、Lは、マイクロリアクターもしくはマイクロリアクターに結合している連結基と、上記-SO₂-X¹基とを連結している二価もしくはそれ以上の連結基を表わす。ただし、Lは単結合であってもよい。二価の連結基としては、炭素原子数が1乃至6のアルキレン基、炭素原子数が3乃至16の脂肪族環基、炭素原子数が6乃至20のアリーレン基、N、SおよびPからなる群より選ばれるヘテロ原子を1乃至3個含む炭素原子数が2乃至20の複素環基、-O-、-S-、-SO-、-SO₂-、-SO₃-、-NR²³-、-CO-およびこれらの組み合わせから群より選ばれる基を一つあるいは複数個組み合わせてなる基であることが好ましい。R²³は、水素原子、炭素原子数が1乃至15のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至21のアラルキル基であることが好まし

く、水素原子もしくは炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基であることがさらに好ましく、水素原子、メチル基もしくはエチル基であることが特に好ましい。

【0046】

L が $\text{—NR}^{23}\text{—}$ 、 $\text{—SONR}^{23}\text{—}$ 、 $\text{—CONR}^{23}\text{—}$ 、 $\text{—NR}^{23}\text{COO—}$ 、および $\text{—NR}^{23}\text{CONR}^{23}\text{—}$ からなる群より選ばれる基を二個以上組み合わせてなる基である場合には、それらの R^{23} 同士が結合して環を形成していてもよい。

【0047】

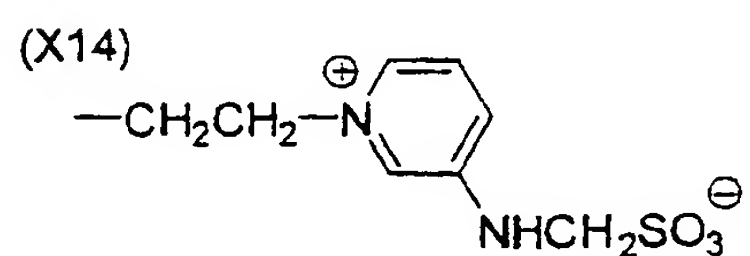
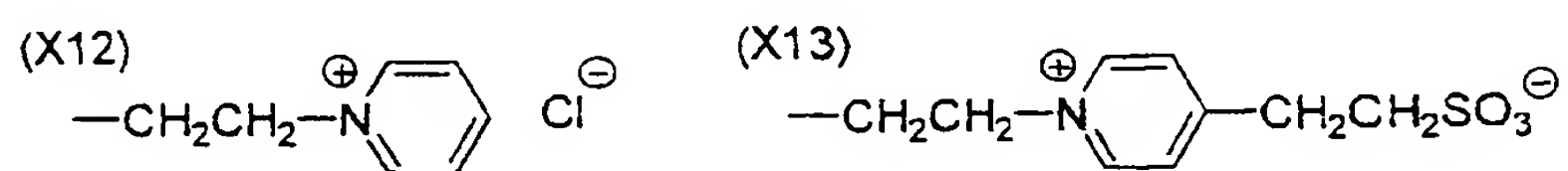
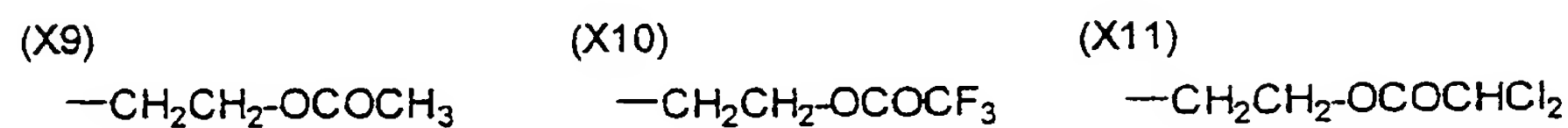
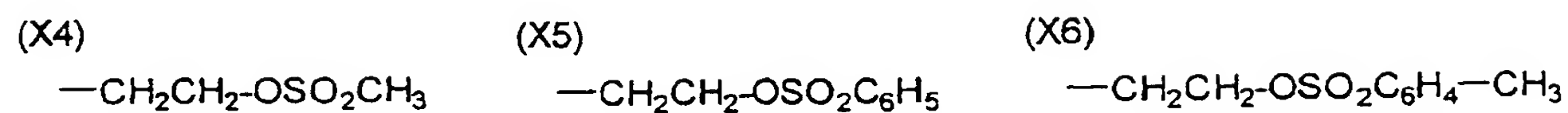
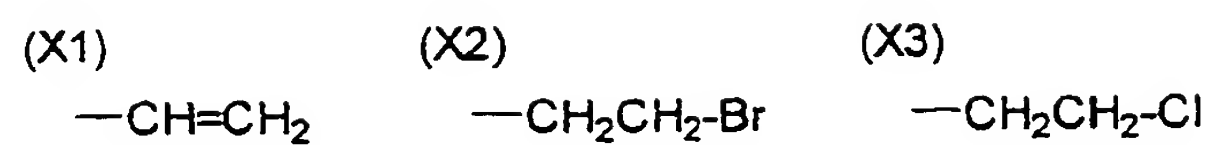
R^{21} のアルキル基、 R^{21} のアリール基、および R^{21} のアラルキル基は、置換基を持ってもよい。このような置換基としては、水酸基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルコキシ基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルケニル基、炭素原子数が 2 乃至 7 のカルバモイル基、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 7 乃至 16 のアラルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、スルファモイル基（もしくはその Na 塩、K 塩等）、スルホ基（もしくはその Na 塩、K 塩等）、カルボン酸基（もしくはその Na 塩、K 塩等）、ハロゲン原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルケニレン基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリーレン基、スルホニル基、およびこれらの組み合わせからなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。

【0048】

上記「 —X^1 」基の好ましい具体例を以下に示す。また、「 $\text{—L—SO}_2\text{—X}^1$ 」として使用できる基の例についても、その後に示す。

【0049】

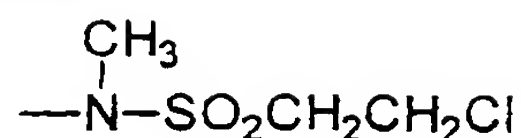
【化 1】



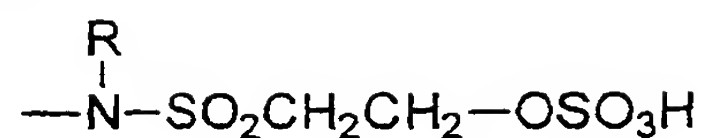
【 0 0 5 0 】

【化 2】

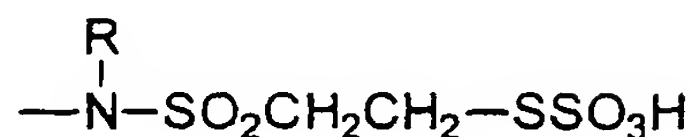
(X15)



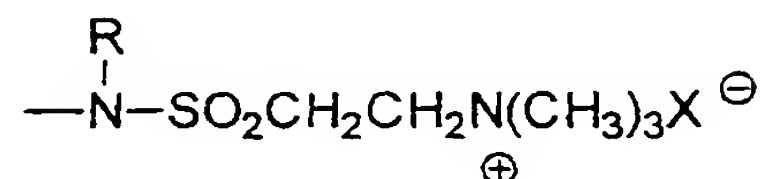
(X16)



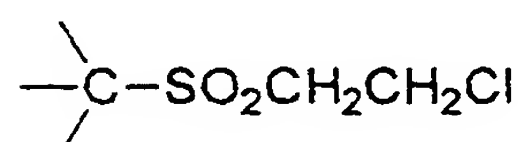
(X17)



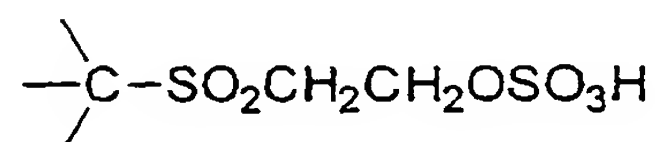
(X18)



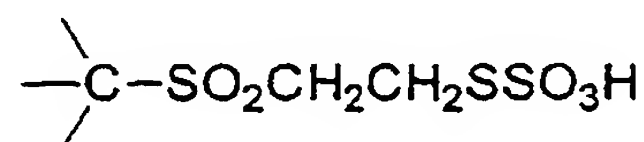
(X19)



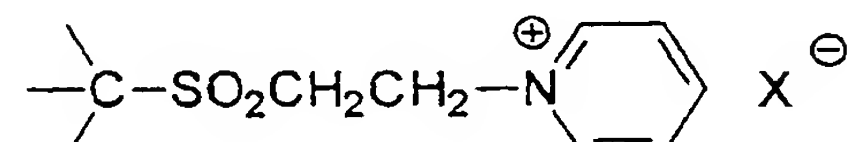
(X20)



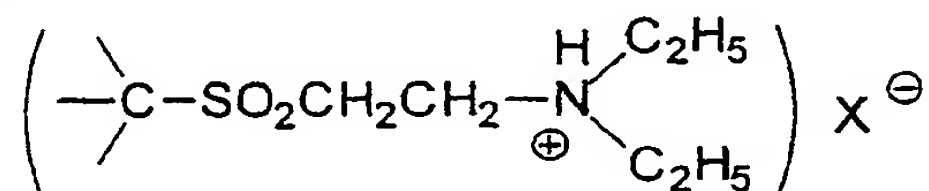
(X21)



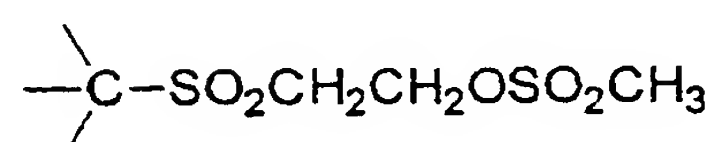
(X22)



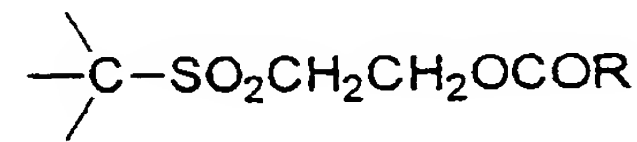
(X23)



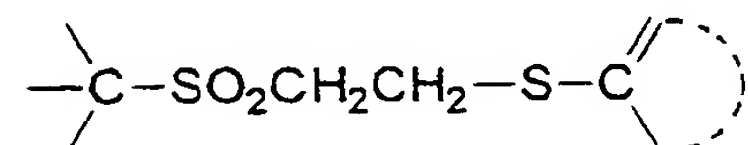
(X24)



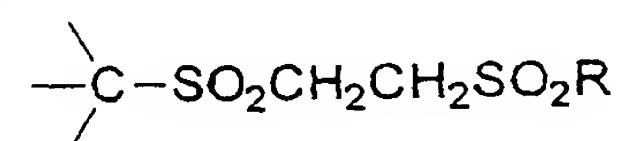
(X25)



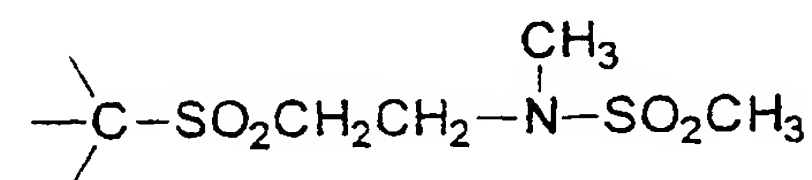
(X26)



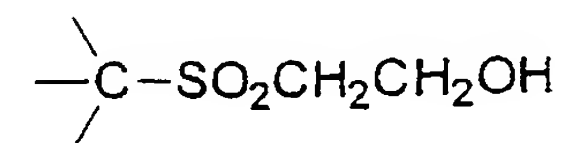
(X27)



(X28)



(X29)



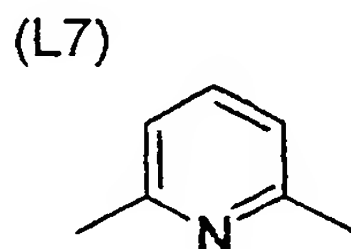
【0051】

「-X¹」は、上記具体例中、(X1)、(X2)、(X3)、(X4)、(X7)、(X8)、(X13)あるいは(X14)であることが好ましく、(X1)あるいは(X2)であることがさらに好ましい。特に好ましいのは、(X1)

【 0 0 5 2 】

【 0 0 5 3 】

【化3】



【 0 0 5 4 】

【 0 0 5 5 】

【0056】



【 0 0 5 7 】

式(2)において、 X^1 および X^2 は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし； R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「 HY 」として脱離する基を表わす； L^2 は連結基を表わす。式(2)における各置換基の具体例は、式(1)における各置換基の具体例と同様である。

【0058】

式(2)で表わされるジスルホン化合物を、前記のマイクロリアクターと、例えば水性雰囲気にて、接触させることによって、本発明の反応性マイクロリアクターを容易に製造することができる。

【0059】

本発明で好ましく用いるジスルホン化合物の代表例を下記に示す。なお、ジスルホン化合物は、二種類以上を混合して用いてもよい。

【0060】

【化 4】

(S1)



(S2)



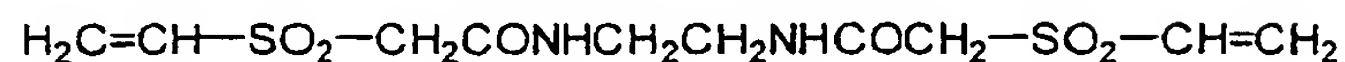
(S3)



(S4)



(S5)



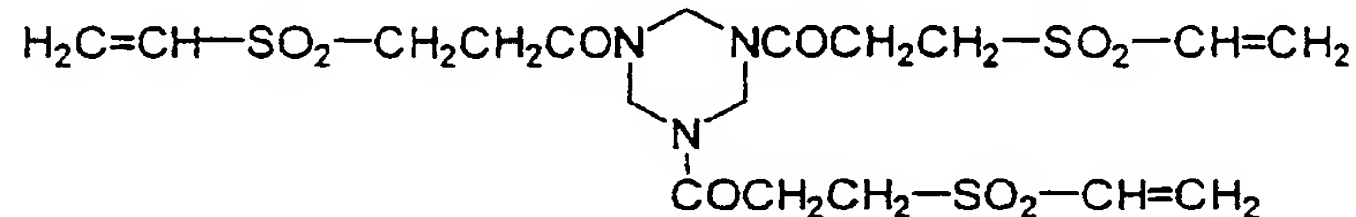
(S6)



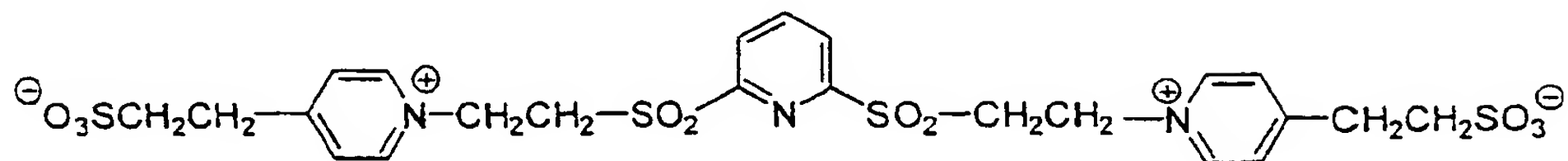
(S7)



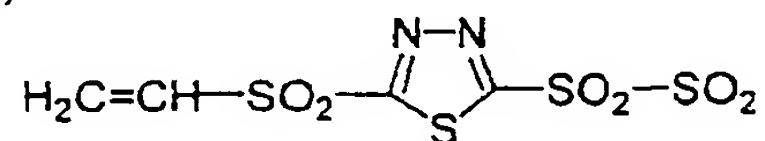
(S8)



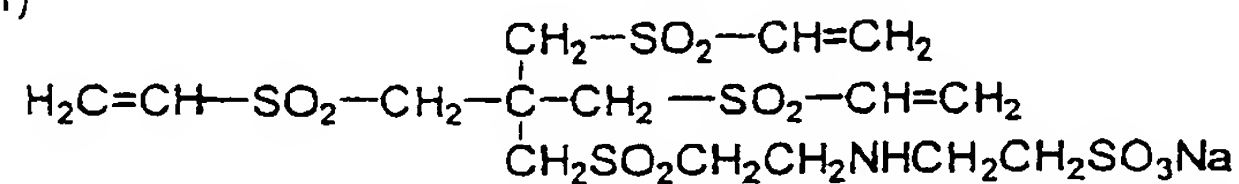
(S9)



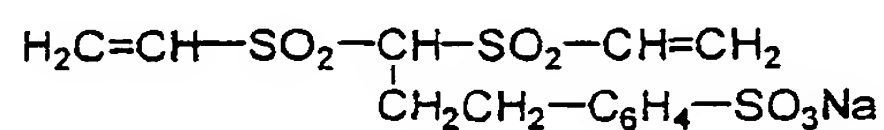
(S10)



(S11)



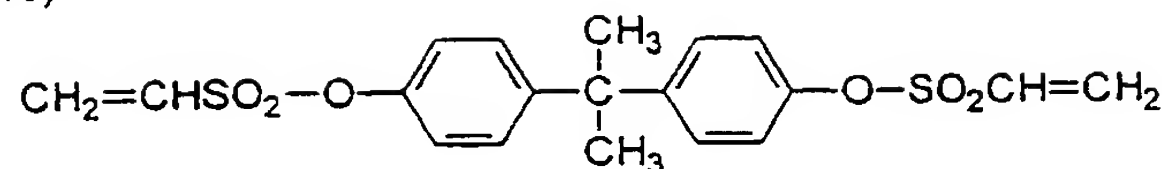
(S12)



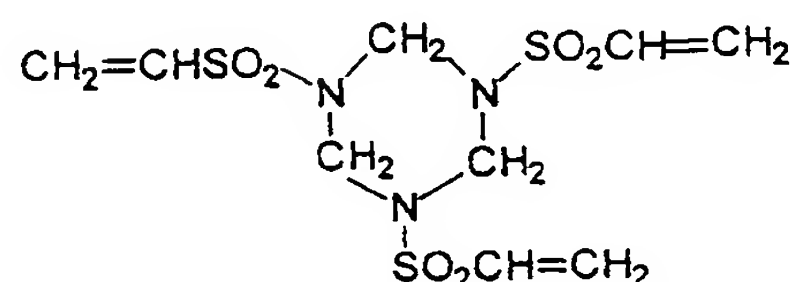
【 0 0 6 1】

【化 5】

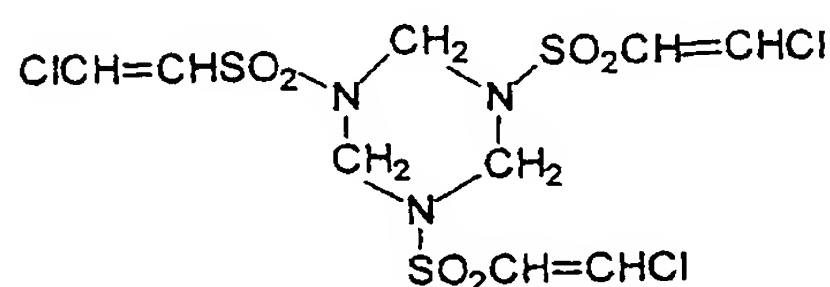
(S13)



(S14)



(S15)



【0062】

式(2)で表わされるジスルホン化合物の代表的な例としては、1, 2-ビス(ビニルスルホニルアセトアミド)エタン[上記のS1に相当する]を挙げることができる。

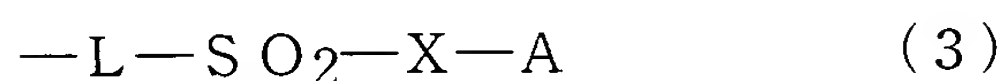
【0063】

本発明で用いるジスルホン化合物の合成法については、たとえば、特公昭47-2429号、同50-35807号、特開昭49-24435号、同53-41551号、同59-18944号等の各種公報に詳細が記載されている。

【0064】

2. 本発明の生物学的素材結合マイクロリアクター及びその製造方法

本発明の生物学的素材結合マイクロリアクターにおいては、特異的結合パートナーの一員の残基を有する下記式(3)で表される基がマイクロリアクター内流路壁面上に結合している。



[式中、Lは、 $-\text{SO}_2-\text{X}-\text{A}$ とマイクロリアクター内流路壁面とを結合する連結基を示し；Xは、 $-\text{CR}^{11}(\text{R}^{12})-\text{CR}^{13}(\text{R}^{14})-$ を表し、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 及び R^{14} は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、

炭素原子数 6 乃至 20 のアリール基、又は炭素原子数 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数 7 乃至 26 のアラルキル基を表し；A は、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。]

【0065】

本発明における特異的結合パートナーは、生物学的な特異的結合を形成する結合パートナーを意味し、その種類は特に限定されるものでないが、抗体もしくは抗体フラグメント／リガンド、抗体もしくは抗体フラグメント／抗原、抗体もしくは抗体フラグメント／ハプテンなどの抗原決定基をもつもの、レセプター／リガンド、アビジン類／ビオチン類、核酸／核酸、核酸／核酸結合タンパク質等の組み合わせが挙げられる。本発明に従って作製される DNA の固定化された固体支持体を DNA チップとして使用する場合には、一定の結合強度を有するためその後のハイブリダイゼーション操作に精度よく反復使用できるものである。

【0066】

ビオチン類としては、ビオチン、ビオシチン、デスチオビオチン、オキシビオチンまたはアビジンと安定な複合体を形成しうるこれらの誘導体が挙げられる。かような安定な複合体を形成しうるとは、ビオチン－アビジン複合体の解離定数（ 10^{-15} M）に近似する解離定数を有する複合体を形成することができることを意味する。一方、アビジン類としては、アビジン、ストレプトアビジンまたはビオチンと安定な複合体を形成しうるこれらの改変体が挙げられる。ここにいふ、「安定な複合体」の意味も、上記、ビオチン類について定義したのと同義である。また改変体とは、天然由来のアビジンまたはストレプトアビジンの修飾体もしくは断片、あるいはそれらの組換え体を意味する。

【0067】

核酸としては特に限定されるものではないが、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が挙げられる。代表例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、そしてペプチド核酸を挙げることができる。これらのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、天然起源のもの（DNA、DNA 断片、RNA、あるいは RNA 断片など）であってもよく、あるいは合成化合物であってもよい。また、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、その糖単位部分に架橋

基を有する LNA と呼ばれる化合物 (J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13252-13253 に記載) などの各種の類縁化合物が含まれる。

【0068】

核酸結合物質として特に限定されるものではないが、二本鎖 DNA 認識物質が挙げられる。二本鎖 DNA 認識物質としては、二本鎖 DNA を認識し、特異的に結合する物質を示す。二本鎖 DNA 認識物質の具体例としては、DNA 転写因子、ミスマッチ修復タンパク質、二本鎖 DNA 認識抗体、又はペプチド核酸などを挙げることができる。二本鎖認識物質としては、Zn フィンガーモチーフまたはリングフィンガーモチーフを持つものが挙げられる。

【0069】

DNA 転写因子は、遺伝子上のプロモーター領域に結合して、DNA から mRNA への転写を制御する物質である (田村隆明著：転写因子 (羊土社 1995 年))。従って、転写因子は特定の配列の 2 本鎖 DNA に特異的に結合することが知られている。

【0070】

多数ある転写因子のうち、Zinc Finger Protein つまり Zinc Finger や Ring Finger モチーフをもつ転写因子群は、真核生物における出現率は非常に高く、ゲノム中の 1% はこれをコードしているらしい。Pabo 等は Zinc Finger モチーフの 3 次構造を解析、DNA と結合するメカニズムの解明した (Science, 252, 809 (1991))。さらに、Choo 等は、遺伝子組換え法により、特定の配列に結合する自然界にはない Zinc Finger Protein 群を作製することに成功している (Nature 372, 642 [1994], PNAS 91, 11163 (1994))。さらに、Scripps Research Institute のグループは Phage Display により新規な Zinc Finger Protein 群の作製に成功している (PNAS 95, 2812, [1998]: 96, 2758 (1999))。このように、Zinc Finger Protein に代表される DNA 転写因子群は、本来 2 本鎖 DNA と結合する性質をもっており、かつ近年の研究によれば、任意の DNA 配列を認識

する組換体の作製も可能となってきた。このような、タンパク質を固定化することにより、2本鎖DNAを効率良く支持体上に捕捉することが可能である。

【0071】

その他、核酸結合物質としてヘリックス・ループ・ヘリックスタンパク質やEtsドメインを持つものも挙げられる。

【0072】

マイクロリアクター内流路壁面に固定する特異的結合パートナーの一員がタンパク質類である場合は、その内在するアミノ基もしくはメルカプト基、タンパク質にアミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、メルカプト基、もしくはカルボキシイミド基などを導入し、スルホニル基を介した反応性基と共有結合を形成する。

【0073】

上記のタンパク質である特異的結合パートナーの一員（例えば、抗体やアビジン類、核酸結合物質）が固定されたマイクロリアクター内流路壁面マイクロリアクター内流路壁面は、水性媒体の存在下、該結合パートナーと特異的に反応する結合パートナーの他の一員（例えばリガンドやビオチン類、核酸）と接触させて、その結合性パートナーを固定することができる。固定すべき特異的結合性の結合パートナーの他の一員（例えばリガンドやビオチン類、核酸）はその固定を外部から検知することが可能なように検知可能な標識（例、蛍光標識、酵素標識など）が結合していることが望ましい。

【0074】

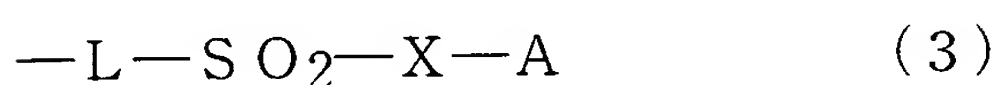
マイクロリアクター内流路壁面に固定されるのが核酸の場合のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の代表的な例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸およびLNAを挙げることができる。これらのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、その分子の一方の端部もしくは端部附近に、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基、メルカプト基などの、ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応する共有結合を形成する反応性基を持つものが利用される。

【0075】

上記のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体が固定されたマイクロリアクター内流路壁面は、水性媒体の存在下、該固定ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体に対して相補性を示すオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド（DNAもしくはその断片、あるいはRNAもしくはその断片）を接触させて、ハイブリダイゼーションを発生させることにより、その相補性オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドを固定することができる。固定すべき相補性のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドは、その固定を外部から検知することが可能なように、検知可能な標識（例、蛍光標識）が結合していることが望ましい。

【0076】

本発明においては、生物学的素材結合マイクロリアクターの特異的結合パートナーの一員（下記の式（3）においては、Aで表される残基）は、下記式（3）で示す通りスルホニル基を介した共有結合により、マイクロリアクター内流路壁面に結合されている。



〔式中、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ とマイクロリアクター内流路壁面とを結合する連結基を示し；Xは、 $\text{—CR}^1(\text{R}^2)\text{—CR}^3(\text{R}^4)\text{—}$ を表し、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は互いに独立に、水素原子、炭素原子数1乃至6のアルキル基、炭素原子数6乃至20のアリール基、又は炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基を表し；Aは、特異的結合パートナーの一員の残基を示す。〕

【0077】

式（3）において、Lは、 $\text{—SO}_2\text{—X—A}$ とマイクロリアクター内流路壁面とを結合する二価もしくはそれ以上の連結基を示す。 —L— の具体例としては、式（1）における —L— の具体例と同義である。

【0078】

式（3）において、炭素原子数1乃至6のアルキル基の例としては、メチル基、エチル基、 n -プロピル基、 n -ブチル基、及び n -ヘキシル基を挙げることができ、メチル基であることが特に好ましい。炭素原子数6乃至20のアリール

基の具体例としては、フェニル基及びナフチル基を挙げることができる。R¹、R²及びR³は共に水素原子であることが好ましい。

炭素原子数1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数7乃至26のアラルキル基の例としては、上記した炭素原子数1乃至6のアルキル基の例と炭素原子数6乃至20のアリール基の例とを組み合わせたものが挙げられる。

【0079】

本発明の生物学的素材結合マイクロリアクターは、前記式(1)で表されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を表面に持つマイクロリアクター内流路壁面上に、該ビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を有する少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員を接触させることにより製造することができる。

【0080】

本発明のマイクロリアクターの流路壁面に共有結合を介して結合されたビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基は、加水分解に対して高い抵抗性を有しているため、容易に安定に保存することができ、また、アミノ基などの反応性基を予め備えているか、あるいはアミノ基などの反応性基が導入されている特異的結合パートナーの一員と迅速に反応して、安定な共有結合を形成することができる。

【0081】

オリゴヌクレオチドやDNA断片などのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の一方の末端には、前記のビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を導入する。このような反応性基は、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基、メルカプト基であることが好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。オリゴヌクレオチドやDNA断片には、通常、クロスリンカーを介してこれらの反応性基が結合される。クロスリンカーとしては、たとえば、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノ-アルキレン基が利用されるが、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノ-ヘキシレン基であることが好ましく、ヘキシレン基であることが特に好ましい。なお、ペプチド核酸(PNA)はア

ミノ基を有しているため、通常は、改めて別に反応性基を導入する必要はない。

【0 0 8 2】

同様にタンパク質もアミノ基またはメルカプト基を有しているため通常は改めて別に反応性基を導入する必要はない。しかしながら、タンパク質の3次元構造はその機能に大きく関与しているので、タンパク質の活性が低下する場合は活性とは関係のない特定の位置に反応基を導入することが好ましい。

【0 0 8 3】

また、同じ目的のために、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体、タンパク質などを接触させたまま該マイクロリアクターを、90%以上の湿度および25乃至50℃（タンパク質の場合は37℃まで）の温度範囲の環境に置くことも好ましい。

【0 0 8 4】

タンパク質、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体などの生物学的素材（即ち、特異的結合パートナーの一員）の固定量（数）は、マイクロリアクター内流路壁面表面に対して、1乃至 10^7 種類/cm²の範囲にあることが好ましい。

【0 0 8 5】

（3）試料中の標的物質の検出方法

本発明はさらに、（a）特異的結合パートナーの一員の残基を有する上記式（3）で表される基がマイクロリアクター内流路壁面上に結合していることを特徴とする生物学的素材結合マイクロリアクターと、該マイクロリアクターの表面に担持された特異的結合パートナーの一員と特異的に結合する標的物質（即ち、前記特異的結合パートナーの他の一員である標的物質）を含む検体とを接触させる工程；及び

（b）該特異的結合パートナーの一員と該標的物質との間の相互の結合の形成を検出する工程；

を含む、標的物質を検出する方法に関する。

【0 0 8 6】

本発明で用いる「標的物質を含む検体」の種類は特に制限されず、例えば、末梢静脈血のような血液、白血球、血清、尿、糞便、精液、唾液、培養細胞、各種

臓器細胞のような組織細胞、その他核酸を含有する任意の試料を用いることができる。試料は上記のような組織細胞などの試料をそのまま使用してもよいが、好ましくは、試料中の細胞を破壊して核酸、リガンドなどを遊離させたものを試料として使用する。試料中の細胞の破壊は、常法により行うことができ、例えば、振とう、超音波等の物理的作用を外部から加えて行うことができる。また、核酸抽出溶液（例えば、SDS、Triton-X、Tween-20等の界面活性剤、又はサポニン、EDTA、プロテアーゼ等を含む溶液等）を用いて、細胞から核酸を遊離させることもできる。核酸抽出溶液を用いて核酸を溶出する場合には、37℃以上の温度でインキュベートすることにより反応を促進することができる。

【0087】

本発明の代表的な態様であるタンパク質チップは、タンパク質相互作用解析、タンパク質発現解析、創薬研究に利用される。さらに、タンパク質が核酸結合タンパク質の場合は、その認識核酸配列によっては変異解析や多型解析に利用することができる。

【0088】

検出原理は標識されたりガンドや核酸との反応である。標識方法としてはRI法と非RI法（蛍光法、ビオチン法、化学発光法等）とが知られているが、とくに限定されるものではない。例えば蛍光法の場合、蛍光標識に利用される蛍光物質としては、核酸の塩基部分やタンパク質アミノ酸残基と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、市販のCy DyeTMシリーズのCy 3、Cy 5等）、ローダミン6 G試薬、N-アセトキシ-N'-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいはAAIF（AAFのヨウ素誘導体）を使用することができる。

【0089】

検体中の標的核酸は、PCR法などで増幅することなく直接検出するのが好ましいが、予め増幅したのちに検出してもよい。標的核酸またはその増幅体は、予め標識しておくことにより容易に検出可能である。核酸を標識するには、酵素（Reverse Transcriptase, DNA polymerase, RNA Polymerase, Terminal deoxytransf

e r a s e など)を用いる方法がよく用いられるが、化学反応により、直接標識物質を結合させてもよい。このような標識方法については、公知の技術として成書に記載されている（野村慎太郎著 脱アイソトープ実験プロトコール 1、秀潤社 1 9 9 4 年、脱アイソトープ実験プロトコール 2、秀潤社 1 9 9 8 年、村松正明著 DNA マイクロアレイと最新 P C R 法標識物質 秀潤社 2 0 0 0 年）。標識物質は、検出可能なシグナルを作ることの可能な物質であることが好ましい。標識物質が、酵素や触媒のような、シグナルの増幅能力のある物質である場合、DNA の検出感度は大きく向上する

【 0 0 9 0 】

しかしながら、前述の標識操作は、一般的に煩雑であるので、さらに好ましい検出方法としては、検体中の核酸を予め標識せずに測定する方法を挙げることができる。これには、例えば 2 本鎖 DNA を認識する DNA 挿入剤、いわゆる DNA インターカレーターを用いることができる。DNA インターカレーターの使用により、検出操作が簡単になるだけでなく、検出感度も向上する。例えば、1 0 0 0 b p の DNA を検出する場合、いわゆる標識法は多くとも数個の標識物質しか導入できないのであるが、インターカレーターを使用する場合は 1 0 0 個以上の標識物質を導入することが可能である。

【 0 0 9 1 】

DNA インターカレーターは、そのもの自体が検出可能なシグナルを形成できる物質であってもよいが、その側鎖にシグナル形成物質を結合していたり、ビオチン—アビジン、抗原—抗体、ハプテン—抗体のような特異結合対を介してインターカレーターに結合していてもよい。本発明における、検出可能なシグナルは、例えば、蛍光検出、発光検出、化学発光検出、生物発光検出、電気化学発光検出、放射能検出、電気化学検出、比色検出により検出可能なシグナルであることが好ましいが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 9 2 】

リガンドが標的である場合は、内在しているアミノ基にシアニン色素（例えば、市販の Cy D y e T M シリーズの Cy 3、Cy 5 等）、ローダミン 6 G 試薬、N—アセトキシ—N2—アセチルアミノフルオレン（A A F）あるいは A A I F

(AAFのヨウ素誘導体)のサクシンイミド体を反応させたものを使用することができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0093】

【実施例】

(1) 石英マイクロリアクターの作成：

石英ガラスの表面に幅 $100\mu\text{m}$ の流路パターンを、Au/Cr のフォトリソグラフィにより形成し、そのパターンをマスクとしてフッ酸でエッチング処理を行い溝を形成した。これに、フッ酸接合法により石英ガラスを張り合わせることににより、溝部分を流路とした石英マイクロリアクターを作成した。

【0094】

(2) 流路壁面にビニルスルホニル基が導入されたマイクロリアクター (①) の作成

2質量%アミノプロピルエトキシシラン (信越化学工業 (株) 製) のエタノール溶液を、(1) のマイクロリアクター流路に注入したのち10分間放置した。流路にエタノールを注入洗浄した後、 110°C で10分間乾燥して、シラン化合物被覆スライドを作成した。次に、このシラン化合物被覆スライドの流路に、5質量%の1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンのリン酸緩衝液 (pH 8.5) 溶液を注入、1時間放置した、アセトニトリルで洗浄し、1時間減圧下乾燥し、壁面にビニルスルホニル基が導入されたマイクロリアクターを作成した。

【0095】

(3) 表面にビニルスルホニル基が導入された平板石英ガラスの作成 (コントロール)

実施例 (2) と同様の方法により、表面にビニルスルホニル基が導入された平板石英 (②) を作成した。

【0096】

(4) 抗体固定化スライドによるリガンドの検出

(4-1) 抗体の固定

Goat Anti Human IgG H+L specific (Jackson ImmunoResearch) をPBSにて希釈し ($100\text{ ng}/\mu\text{L}$)、 $0.5\mu\text{l}$ を上記実施例(2)にて作製した壁面にビニルスルホン基が導入されたマイクロリアクター(①)の流路に注入した。3時間放置した後、3%カゼイン/ 0.05% Tween 20-PBS (PBS-T)を注入し1時間放置後、PBSにより洗浄し、抗体固定マイクロリアクターを得た。

【0097】

また、同様に $2\mu\text{l}$ のGoat Anti Human IgG H+L specific (Jackson ImmunoResearch)を希釈液を平板石英ガラスの作成(コントロール)に点着、3時間放置後、3%カゼイン/ 0.05% Tween 20-PBS (PBS-T)を注入し1時間放置し、ブロッキングを行った。

【0098】

(4-2) Human IgGの検出

上記(4-1)で作成した抗体固定マイクロリアクター(①)に、ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch) $0.5\mu\text{l}$ を注入15分間放置後、PBSを注入することによりで洗浄した。次に 0.1% カゼイン入りPBSで1000倍に希釈されたGoat Anti Human IgG Fc specific-HRP (Jackson ImmunoResearch) $0.1\mu\text{l}$ を注入15分間放置後、PBSを注入することによりで洗浄した。さらに、ECL発光基質(アマシャム社製) $0.5\mu\text{l}$ を注入後LAS1000(富士フィルム社製)により発光強度を測定した

【0099】

同様に、抗体固定平板石英(②)をヒトIgG PBS溶液 2ml に浸漬15分間放置後、PBSにて洗浄し、 0.1% カゼイン入りPBSで1000倍に希釈されたGoat Anti Human IgG Fc specific-HRP (Jackson ImmunoResearch) 2ml に15分間浸漬した。さらにECL発光基質(アマシャム社製) 1ml に浸漬後、LAS

1 0 0 0（富士フィルム社製）により発光強度を測定した。結果を以下の表 1 に示す。

【 0 1 0 0 】

【表 1】

		本発明のマイクロリアクター (①)	対照の平板リアクター (②)
実験 No	IgG 濃度 (ng/ml)	発光強度	発光強度
1	1 0 0	15600	8500
2	1 0	8250	6300
3	1	5300	4200
4	0	3800	3900

【 0 1 0 1 】

この結果より、本発明のマイクロリアクターにおいては抗体が効率よく結合していることが明らかである。また、対照となる平板リアクターよりも、必要とする試薬液量が少なくかつ、S/Nも高いことが明らかである。

【 0 1 0 2 】

【発明の効果】

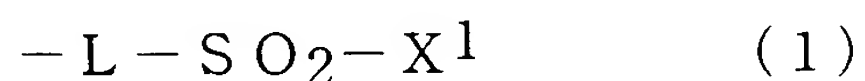
本発明により、迅速かつ安定に結合固定可能な反応性マイクロリアクター、該反応性マイクロリアクター内流路壁面に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材結合マイクロリアクター、並びにそれらの製造方法及び利用方法を提供することが可能になった。本発明のマイクロリアクターは、必要とする試薬液量が少なく、かつS/Nも高いという利点を有する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 迅速かつ安定に結合固定可能な反応性マイクロリアクター、該反応性マイクロリアクター内流路壁面に少なくとも一つの特異的結合パートナーの一員が結合固定されてなる生物学的素材結合マイクロリアクター、並びにそれらの製造方法及び利用方法を提供すること。

【解決手段】 特異的結合パートナーの一員と結合することができる下記式（1）で表される基が流路壁面の一部または全面に結合している、反応性マイクロリアクター。



〔式中、 X^1 は、 $-CR^1=CR^2R^3$ または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ を表わし、 R^1 、 R^2 及び R^3 は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、及び炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし、 Y は、求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「 HY 」として脱離する基を表わす；そして、 L は連結基を表わす〕。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 8 5 4 5 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社